

**Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure zur gezielten Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens.**

5 Die Erfindung betrifft die Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur gezielten Hemmung der Expression eines vorgegebenen, gegenüber einem Ursprungsgen punktmutierten Zielgens in einer Zelle. Sie betrifft weiterhin die Verwendung einer solchen Ribonukleinsäure zur 10 Herstellung eines Medikaments, ein Medikament und ein Verfahren zur gezielten Hemmung der Expression des genannten Zielgens in einer Zelle.

Aus der DE 101 00 586 C1 ist ein Verfahren zur Hemmung der 15 Expression eines Zielgens in einer Zelle bekannt, bei dem ein Oligoribonukleotid mit doppelsträngiger Struktur in die Zelle eingeführt wird. Ein Strang der doppelsträngigen Struktur ist dabei komplementär zum Zielgen.

20 Aus Elbashir, S. M. et al., Nature 411 (2001), Seiten 494 - 498 ist es bekannt, dass eine kurze dsRNA, in welcher drei Nukleotide nicht komplementär zum Zielgen sind, die Expression eines Zielgens kaum noch hemmt. Eine vollständig komplementäre dsRNA bewirkt dagegen eine effektive Hemmung 25 der Expression des Zielgens.

Aus Holen, T. et al., Nucleic Acids Research 30 (2002), Seiten 1757 - 1766, ist es bekannt, dass eine Hemmung der Expression eines Gens durch kurze dsRNA im Wege der RNA- 30 Interferenz auch mit dsRNAs möglich ist, deren einer Strang ein oder zwei zum Zielgen nicht komplementäre Nukleotide aufweist.

Viele Krankheiten und Entartungen von Zellen beruhen darauf, dass ein für Zellen wichtiges Gen, häufig ein Proto-Onkogen, durch eine oder wenige Punktmutationen verändert ist. Das Problem bei der Behandlung einer solchen Krankheit oder

5 solcher Zellen mit den bisher bekannten Methoden besteht darin, dass die Inhibition der Expression des mutierten Gens häufig ebenfalls zu einer Inhibition des nicht mutierten Gens führt. Dies hat oft gravierende Nebenwirkungen zur Folge.

10 Aufgabe der vorliegende Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu vermeiden. Insbesondere soll eine Verwendung einer dsRNA zur gezielten Hemmung der Expression eines gegenüber einem Ursprungsgen punktmutierten Zielgens in einer Zelle bereitgestellt werden, bei der die Expression des

15 Ursprungsgens weitgehend unbeeinflusst bleibt. Weiterhin soll ein Medikament und ein Verfahren zur gezielten Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens sowie eine Verwendung zur Herstellung des Medikaments bereitgestellt werden. Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 2, 17 und 31

20 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 3 bis 16, 18 bis 30 und 32 bis 41.

Erfindungsgemäß ist eine Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur gezielten Hemmung der Expression

25 eines vorgegebenen, gegenüber einem Ursprungsgen punktmutierten Zielgens in einer Zelle vorgesehen, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zum Zielgen komplementären Bereich aufweist, in welchem mindestens ein Nukleotid nicht komplementär zum Zielgen und mindestens ein Nukleotid mehr

30 als zum Zielgen nicht komplementär zum Ursprungsgen ist. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung einer solchen dsRNA zur Herstellung eines Medikaments zur gezielten Hemmung der Expression eines vorgegebenen, gegenüber einem

Ursprungsgen punktmutierten Zielgens in einer Zelle. Ein Nukleotid ist im Sinne dieser Erfindung "komplementär" zum Zielgen oder Ursprungsgen, wenn es mit einem ihm darin in seiner Sequenzposition entsprechenden Nukleotid eine

5 spezifische Watson-Crick-Basenpaarung ausbilden kann. Unter dem Zielgen wird im Allgemeinen der DNA-Strang der doppelsträngigen in der Zelle vorhandenen DNA verstanden, welcher komplementär zu einem bei der Transkription als Matrize dienenden DNA-Strang einschließlich aller  
10 transkribierten Bereiche ist. Es handelt sich dabei also im Allgemeinen um den Sinn-Strang. Der Strang S1 kann somit komplementär zu einem bei der Expression gebildeten RNA-Transkript oder dessen Prozessierungsprodukt, wie z.B. einer mRNA, sein. Es kann z.B. ausreichend sein, wenn der Strang S1  
15 komplementär zu einem Teil des 3'-untranslatierten Bereichs der mRNA ist. Bei dem Zielgen kann es sich aber auch um einen Teil eines viralen Genoms handeln. Das virale Genom kann auch das Genom eines (+)-Strang-RNA-Virus, insbesondere eines Hepatitis C-Virus, sein.

20 Das Ursprungsgen kann jedes beliebige Gen sein, welches von dem zu hemmenden Zielgen nur durch eine oder wenige Punktmutationen abweicht. Im Allgemeinen handelt es sich dabei um ein Wildtyp-Gen. Eine dsRNA liegt vor, wenn die aus  
25 einem oder zwei Nukleinsäure-Strängen bestehende Ribonukleinsäure eine doppelsträngige Struktur aufweist. Nicht alle Nukleotide der dsRNA müssen innerhalb der dsRNA kanonische Watson-Crick-Basenpaarung aufweisen. Die maximal mögliche Zahl der Basenpaare ist die Zahl der Nukleotide in  
30 dem kürzesten in der dsRNA enthaltenden Strang. Der zum Zielgen komplementäre Bereich kann weniger als 25 aufeinander folgende Nukleotide, insbesondere 19 bis 24, bevorzugt 21 bis 23, besonders bevorzugt 21 Nukleotide aufweisen. Der Strang

S1 kann weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24 Nukleotide aufweisen. Es hat sich gezeigt, dass kurze dsRNAs besonders effizient in der Hemmung der Expression eines Zielgens sind. Diese dsRNAs 5 werden auch als siRNAs (short interfering RNAs) bezeichnet.

Bei der gezielten Hemmung wird die Expression des Ursprungsgens weniger inhibiert als diejenige des Zielgens. Im Idealfall bleibt die Expression des Ursprungsgens weit 10 gehend unbeeinflusst. Dazu wird gezielt eine die Expression des Zielgens nicht optimal hemmende dsRNA verwendet. So kann eine dsRNA bereitgestellt werden, welche zum Ursprungsgen so wenig komplementär ist, dass dessen Expression weit gehend unbeeinflusst bleibt. Nebenwirkungen durch Hemmung des 15 Ursprungsgens können vermieden oder verringert werden.

Die Hemmung der Expression durch die dsRNA erfolgt vorzugsweise nach dem Prinzip der RNA-Interferenz. Das zum Zielgen nicht komplementäre Nukleotid ist bevorzugt nicht am 20 3'- oder am 5'-Ende des Bereichs gelegen. Idealerweise liegt das nicht komplementäre Nukleotid im mittleren Teil des Bereichs. Das Zielgen kann gegenüber dem Ursprungsgen eine oder zwei Punktmutationen aufweisen. Dann ist die 25 erfundungsgemäße Verwendung zur gezielten Hemmung der Expression des Zielgens besonders geeignet, gezielt nur diese Expression, nicht aber diejenige des Ursprungsgens zu hemmen.

Bei einer Ausgestaltung der Erfundung ist das Ursprungsgen ein Proto-Onkogen und das Zielgen ein davon abgeleitetes 30 Onkogen. Ein Onkogen unterscheidet sich häufig von dem ihm entsprechenden zellulären Proto-Onkogen nur durch eine einzige Punktmutation. Die Hemmung der Expression des Onkogens mit herkömmlicher dsRNA bewirkt daher üblicherweise

auch eine Hemmung der Expression des entsprechenden Proto-Onkogens. Das ist häufig mit so schwer wiegenden Nebenwirkungen verbunden, dass eine Verwendung herkömmlicher dsRNA zur Hemmung des Zielgens in einem Organismus kaum möglich ist.

Die Zelle kann dabei eine Tumorzelle sein. Bei einer Ausgestaltung der Erfindung ist ein Nukleotid des Bereichs nicht komplementär zum Zielgen und zwei Nukleotide des Bereichs sind nicht komplementär zum Ursprungsgen. Bereits ein derart geringer Unterschied in der Zahl komplementärer Nukleotide kann ausreichen, um die Expression des Zielgens nahezu vollständig zu hemmen und die Expression des Ursprungsgens weitgehend unbeeinflusst zu lassen.

In einer Ausgestaltung des Verfahrens ist innerhalb der dsRNA mindestens ein Basenpaar nicht komplementär, d.h. die Nukleotide des Basenpaares sind nicht spezifisch nach Watson-Crick gepaart. Durch die Variation der Zahl der nicht komplementären Basenpaare innerhalb der dsRNA kann die Wirksamkeit der dsRNA moduliert werden. Eine reduzierte Komplementarität innerhalb der dsRNA verringert deren Stabilität in der Zelle.

Vorzugsweise weist die dsRNA zumindest an einem Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang auf. Ein Ende ist dabei ein Bereich der dsRNA, in welchem ein 5'- und ein 3'-Strangende vorliegen. Eine nur aus dem Strang S1 bestehende dsRNA weist demnach eine Schleifenstruktur und nur ein Ende auf. Eine aus dem Strang S1 und einem Strang S2 gebildete dsRNA weist zwei Enden auf. Ein Ende wird dann jeweils von einem auf dem Strang S1 und einem auf dem Strang S2 liegenden

Strangende gebildet. Einzelsträngige Überhänge verringern die Stabilität der dsRNA in Blut, Serum und Zellen und verstärken gleichzeitig die expressionshemmende Wirkung der dsRNA.

Besonders vorteilhaft ist es, wenn die dsRNA den Überhang  
5 ausschließlich an einem, insbesondere ihrem das 3'-Ende des Strangs S1 aufweisenden, Ende aufweist. Das andere Ende ist dann bei einer zwei Enden aufweisenden dsRNA glatt, d.h. ohne Überhänge, ausgebildet. Überraschenderweise hat es sich gezeigt, dass zur Verstärkung der expressionshemmenden  
10 Wirkung der dsRNA ein Überhang an einem Ende der dsRNA ausreichend ist, ohne dabei die Stabilität in einem solchen Maße zu erniedrigen wie durch zwei Überhänge. Eine dsRNA mit nur einem Überhang hat sich sowohl in verschiedenen Zellkulturmedien als auch in Blut, Serum und Zellen als  
15 hinreichend beständig und besonders Wirksam erwiesen. Die Hemmung der Expression ist besonders effektiv, wenn sich der Überhang am 3'-Ende des Strangs S1 befindet.

Der Strang S1 oder ein gegebenenfalls in der dsRNA  
20 enthaltener Strang S2 kann zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär sein. Die dsRNA kann in einer Zubereitung vorliegen, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion und Injektion, insbesondere zur intravenösen, intraperitonealen oder intratumoralen Infusion  
25 oder Injektion, geeignet ist. Die Zubereitung kann dabei aus einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, und der dsRNA bestehen. Es hat sich nämlich überraschenderweise herausgestellt, dass eine lediglich in einem solchen Puffer gelöste und  
30 verabreichte dsRNA von der Zelle aufgenommen wird und die Expression des Zielgens hemmt, ohne dass die dsRNA dazu in einem besonderen Vehikel verpackt sein muss.

Vorzugsweise liegt die dsRNA in einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, oder von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Virus-Kapsid oder einem Kapsoid

5 umschlossen vor. Die dsRNA kann oral, mittels Inhalation, Infusion oder Injektion, insbesondere intravenöser, intraperitonealer oder intratumoraler Infusion oder Injektion, verabreicht werden. Vorzugsweise wird die dsRNA in einer Dosierung von höchstens 5 mg, insbesondere höchstens

10 2,5 mg, bevorzugt höchstens 200  $\mu$ g, besonders bevorzugt höchstens 100  $\mu$ g pro kg Körpergewicht und Tag, einem Säugetier, vorzugsweise einem Menschen, verabreicht.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Medikament zur gezielten

15 Hemmung der Expression eines vorgegebenen, gegenüber einem Ursprungsgen punktmutierten Zielgens in einer Zelle, enthaltend eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA), wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zum Zielgen

20 komplementären Bereich aufweist, in welchem mindestens ein Nukleotid nicht komplementär zum Zielgen und mindestens ein Nukleotid mehr als zum Zielgen nicht komplementär zum Ursprungsgen ist.

Erfindungsgemäß ist weiterhin ein Verfahren zur gezielten

25 Hemmung der Expression eines vorgegebenen, gegenüber einem Ursprungsgen punktmutierten Zielgens in einer Zelle vorgesehen, wobei eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) in die Zelle eingeführt wird und ein Strang S1 der dsRNA einem zum Zielgen komplementären Bereich

30 aufweist, in welchem mindestens ein Nukleotid nicht komplementär zum Zielgen und mindestens ein Nukleotid mehr als zum Zielgen nicht komplementär zum Ursprungsgen ist.

Wegen der weiteren vorteilhaften Ausgestaltungen des erfindungsgemäßen Medikaments und des erfindungsgemäßen Verfahrens wird auf die vorangegangenen Ausführungen verwiesen.

5

Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Zeichnungen beispielhaft erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 eine grafische Darstellung der Hemmung der  
10 Expression eines HCV-Luziferase-Fusionsproteins  
durch dsRNAs, welche in unterschiedlichem Maße  
komplementär zu einer Sequenz eines Zielgens sind  
und

15 Fig. 2 eine grafische Darstellung der Hemmung der  
Expression eines HCV-Luziferase-Fusionsproteins  
durch dsRNAs, welche in unterschiedlichem Maße  
komplementär zu einer Sequenz eines Zielgens sind  
und teilweise aus nicht vollständig zueinander  
20 komplementären RNA-Strängen gebildet sind.

Zu Herstellung eines Reportersystems wurde eine 26 Nukleotide lange Sequenz einer als Zielgen dienenden, dem 3'-nicht-translatierten Bereich einer HCV-RNA entsprechenden cDNA-  
25 Sequenz mit dem offenen Leserahmen des Luziferase-Gens aus dem Expressionsvektor pGL3 fusioniert. Der Expressionsvektor pGL3 stammt von der Firma Promega und ist unter der Gene Accession Number U47296 beim National Center for Biotechnology Information (NCBI), National Library of  
30 Medicine, Building 38A, Bethesda, MD 20894, USA, registriert worden. Als Luziferase-Gen sind die Nukleotide 280 bis 1932 verwendet worden. Die 26 Nukleotide lange Sequenz ist eine in sehr vielen HCV-Genomen und deren Subtypen vorkommende hoch

konservierte Sequenz. Bei dem unter der Gene Accession Number D89815 beim NCBI registrierten HCV-Genom entsprechen die 26 Nukleotide den Nukleotiden 9531 bis 9556. Sie weisen die folgende Sequenz auf:

5

5'-gtcacggct agctgtgaaa ggtccgt-3' (SEQ ID NO: 1).

Das resultierende Fusions-Gen ist als BamHI/NotI-DNA-Fragment in das eukaryotische Expressionsplasmid pcDNA 3.1 (+) von der 10 Firma Invitrogen GmbH, Technologiepark Karlsruhe, Emmy-Noether Strasse 10, D-76131 Karlsruhe, Katalog Nr. V790-20, kloniert worden. Das resultierende Plasmid wird als p8 bezeichnet.

15 Als Kontrolle für die Transfektionseffizienz ist das Plasmid pCMV $\beta$ Gal der Firma Clontech, Gene Accession Number U13186, NCBI, verwendet worden. Dieses Plasmid kodiert für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase und bewirkt dessen Expression.

20 Das das Fusions-Gen enthaltende Plasmid, das zur Kontrolle dienende Plasmid und unterschiedliche dsRNAs sind gemeinsam durch Transfektion in Zellen der Leberzelllinie HuH-7 (JCRB0403, Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank, National Institute of Health Sciences, Kamiyoga 1-25 18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan) eingeführt worden. Die durch die dsRNAs herbeigeführte Hemmung der Expression des Luziferase-Gens ist im Verhältnis zur Expression des  $\beta$ -Galaktosidase-Gens bestimmt worden.

30 Die eingesetzten dsRNAs weisen folgende, im Sequenzprotokoll mit SEQ ID NO:2 bis SEQ ID NO:13 bezeichneten Sequenzen auf:

HCV1+2, deren Strang S1 vollständig komplementär zu der HCV-Sequenz in dem fusionierten HCV-Luziferase-Gen ist:

S2: 5'- ACG GCU AGC UGU GAA AGG UCC GU-3' (SEQ ID NO:2)

5 S1: 3'-AG UGC CGA UCG ACA CUU UCC AGG -5' (SEQ ID NO:3)

HCV3+4, welche weder zu der HCV- noch zu der Luziferase-Sequenz in dem fusionierten HCV-Luziferase-Gen komplementär ist und als Negativkontrolle dient:

10

S2: 5'- AGA CAG UCG ACU UCA GCC U GG-3' (SEQ ID NO:12)

S1: 3'-GG UCU GUC AGC UGA AGU CGG A -5' (SEQ ID NO:13)

HCV5+6, deren Strang S1 abgesehen von dem durch Fettdruck 15 hervorgehobenen Nukleotid komplementär zu der HCV-Sequenz in dem fusionierten HCV-Luziferase-Gen ist:

S2: 5'- ACG GCU AGC UGU GAA UGG UCC GU-3' (SEQ ID NO:6)

S1: 3'-AG UGC CGA UCG ACA CUU ACC AGG -5' (SEQ ID NO:7)

20

HCV7+8, deren Strang S1 abgesehen von den zwei durch Fettdruck hervorgehobenen Nukleotiden komplementär zu der HCV-Sequenz in dem fusionierten HCV-Luziferase-Gen ist:

25 S2: 5'- ACG GCA AGC UGU GAA UGG UCC GU-3' (SEQ ID NO:8)

S1: 3'-AG UGC CGU UCG ACA CUU ACC AGG -5' (SEQ ID NO:9)

Luc1+2, deren Strang S1 vollständig komplementär zu einer 30 Luziferase-Sequenz in dem fusionierten HCV-Luziferase-Gen ist und als Positivkontrolle dient:

S2: 5'- CGU UAU UUA UCG GAG UUG CAG UU-3' (SEQ ID NO: 10)  
 S1: 3'-GC GCA AUA AAU AGC CUC AAC GUC -5' (SEQ ID NO: 11)

K3s+K3as, welche weder zu der HCV- noch zu einer Luziferase-  
 5 Sequenz in dem fusionierten HCV-Luziferase-Gen komplementär  
 ist und als Negativkontrolle dient:

S2: 5'- G AUG AGG AUC GUU UCG CAU GA-3' (SEQ ID NO: 4)  
 S1: 3'-UCC UAC UCC UAG CAA AGC GUA -5' (SEQ ID NO: 5)

10

HCV5+2, deren Strang S1 vollständig komplementär zu der HCV-  
 Sequenz ist und deren Strang S2 abgesehen von dem durch  
 Fettdruck hervorgehobenen Nukleotid komplementär zu der HCV-  
 Sequenz in dem fusionierten HCV-Luziferase-Gen ist:

15

S2: 5'- ACG GCU AGC UGU GAA UGG UCC GU-3' (SEQ ID NO:6)  
 S1: 3'-AG UGC CGA UCG ACA CUU UCC AGG -5' (SEQ ID NO:3)

HCV1+6, deren Strang S2 vollständig komplementär zu der HCV-  
 20 Sequenz ist und deren Strang S1 abgesehen von dem durch  
 Fettdruck hervorgehobenen Nukleotid komplementär zu der HCV-  
 Sequenz in dem fusionierten HCV-Luziferase-Gen ist:

S2: 5'- ACG GCU AGC UGU GAA AGG UCC GU-3' (SEQ ID NO:2)  
 25 S1: 3'-AG UGC CGA UCG ACA CUU **ACC** AGG -5' (SEQ ID NO:7)

HuH-7-Zellen sind in DMEM mit 10 % FCS kultiviert worden. Zur  
 Vorbereitung einer Transfektion wurden 2 x 10E4 Zellen pro  
 Vertiefung einer 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Die  
 30 Zellen sind 24 Stunden nach der Aussaat mittels je 110 µl  
 Transfektionsmedium pro Vertiefung der 96-Well-  
 Zellkulturplatte transfiziert und in diesem Gesamtvolumen

weiter kultiviert worden. Jede Transfektion ist dreifach durchgeführt worden.

Dazu sind zunächst 3 µg des Plasmids pCMVßGal mit 1 µg des 5 Plasmids p8 gemischt worden. Das Transfektionsmedium enthielt je Vertiefung 0,25 µg des Gemischs der Plasmide und 200, 100, 50, 25, 12,5 oder 0 nmol/l einer der genannten dsRNAs.

Zur Transfektion wurde "Gene Porter 2" der Firma PEQLAB Bio-10 technologie GmbH, Carl-Thiersch-Str. 2 b, D-91052 Erlangen, Katalog Nummer 13-T202007 gemäß Herstellervorschrift eingesetzt.

Anschließend sind die Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert 15 worden. Einen Tag nach der Transfektion sind pro Vertiefung 35 µl frisches Medium zugegeben und die Zellen für weitere 24 h inkubiert worden.

Der Effekt der eingesetzten dsRNAs wurde durch 20 Quantifizierung der exprimierten β-Galactosidase mittels "Galacto-Star" der Firma Tropix, 47 Wiggins Avenue, Bedford, MA 01730, USA Katalog-Nummer BM100S, und der Effekt der exprimierten Luziferase mittels "Luciferase" der Firma Tropix, Katalog-Nummer BC100L, durch Chemolumineszenz-25 Reaktion ermittelt. Dazu wurden Lysate der Zellen gemäß den Herstellervorschriften hergestellt und davon für den Nachweis der β-Galactosidase je 2 µl pro Analyse und für den Nachweis der Luziferase je 5 µl pro Analyse eingesetzt. Die Messung der Chemolumineszenz erfolgte in einem Sirius-Luminometer der 30 Firma Berthold Detection Systems GmbH, Bleichstrasse 56-68, D-75173 Pforzheim, Deutschland. Die relative Aktivität der Luziferase als Maß für die Expression wird ermittelt, indem jeweils der für Luziferase ermittelte Wert der

Chemolumineszenz durch den für  $\beta$ -Galactosidase ermittelten Wert dividiert wird. Für jeweils 3 so ermittelte Werte wird ein Mittelwert berechnet. Der Mittelwert für ohne dsRNA transfizierte Zellen wird willkürlich als 1,0 definiert. Die 5 anderen Mittelwerte sind dazu ins Verhältnis gesetzt und in den Figuren 1 und 2 grafisch dargestellt.

Luc1+2 (Positivkontrolle) führte zur stärksten Hemmung der Luziferaseaktivität (Fig. 1 und 2). In Gegenwart von HCV1+2, 10 welches vollständig komplementär zur Zielsequenz für das Reporterplasmid war, ist ebenfalls eine deutliche Reduktion der Luziferaseaktivität erkennbar (Fig. 1 und 2). Mit abnehmender Konzentration von HCV1+2 stieg die Luziferaseaktivität an. Das in einem Nukleotid nicht zur 15 Zielsequenz komplementäre Oligonukleotid HCV5+6 ist ähnlich effizient in der Luziferasehemmung wie HCV1+2, insbesondere bei niedrigen Konzentrationen (Fig. 1). Für die Spezifität dieser dsRNA bedeutet das, dass es nicht ausreicht, wenn die dsRNA zum Zielgen komplementär, aber zum Ursprungsgen mit 20 einem Nukleotid nicht komplementär ist, um die Expression des Zielgens spezifisch gegenüber der Expression des Ursprungsgens zu hemmen.

HCV7+8 hemmt die Expression der Luziferase sowohl bei hohen 25 als auch bei niedrigen Konzentrationen nur im Maße der Negativkontrollen HCV3+4 und K3S+K3AS (Fig. 1 und 2). Die geringe Hemmung der Luziferaseaktivität ist als unspezifischer Effekt zu erachten. Für die Spezifität dieser dsRNA bedeutet das, dass es ausreicht, wenn die dsRNA zu dem 30 Zielgen komplementär oder nur mit einem Nukleotid nicht komplementär, aber zum Ursprungsgen in zwei Nukleotiden nicht komplementär ist, um die Expression des Zielgens spezifisch gegenüber der Expression des Ursprungsgens zu hemmen.

In HCV5+2 ist ein Nukleotid im Sinn-Strang S2 nicht komplementär zum Antisinn-Strang S1, wobei der Antisinn-Strang S1 vollständig komplementär zum Zielgen ist. Diese 5 dsRNA ist so effizient wie LUC1+2 und HCV1+2 (Fig. 1 + 2). Das ist überraschend, da eine um ein Basenpaar reduzierte Komplementarität innerhalb der dsRNA eine geringere Stabilität der dsRNA in der Zelle und deshalb eine geringere Effizienz erwarten ließ.

10

In HCV6+1 ist ein Nukleotid im Antisinn-Strang S1 nicht komplementär zum Sinn-Strang S2, wobei der Antisinn-Strang S1 auch mit einem Nukleotid nicht komplementär zum Zielgen ist. HCV6+1 hemmt die Expression weniger effizient als HCV5+6, 15 aber effizienter als HCV7+8 (Fig. 2). Für die Spezifität und Effizienz der expressionshemmenden Wirkung der dsRNA kommt es somit mehr auf die Sequenz des Antisinn-Strangs S1 als diejenige des Sinn-Strangs S2 an.

20 Die als Negativkontrolle dienenden HCV3+4 (Fig. 1) und K3S+K3AS (Fig. 2) führten zu keiner bzw. einer geringen Hemmung der Luziferase-Aktivität. Die geringe Hemmung ist unspezifisch, da sie nicht von der eingesetzten Konzentration der dsRNAs abhängt.

25

Die Daten zeigen, dass mindestens zwei nicht zu einem Ursprungsgen komplementäre Nukleotide im Antisinn-Strang einer dsRNA notwendig sind, um eine Inhibition der Expression des Ursprungsgens zu verhindern. Weiterhin zeigen die Daten, 30 dass eine Modulation der Wirksamkeit der Hemmung der Expression durch eine dsRNA möglich ist, indem das Maß der Komplementarität der die dsRNA bildenden Einzelstränge verringert wird.

## Patentansprüche

1. Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur gezielten Hemmung der Expression eines vorgegebenen, gegenüber einem Ursprungsgen punktmutierten Zielgens in einer Zelle, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zum Zielgen komplementären Bereich aufweist, in welchem mindestens ein Nukleotid nicht komplementär zum Zielgen und mindestens ein Nukleotid mehr als zum Zielgen nicht komplementär zum Ursprungsgen ist.  
5
- 10 2. Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur Herstellung eines Medikaments zur gezielten Hemmung der Expression eines vorgegebenen, gegenüber einem Ursprungsgen punktmutierten Zielgens in einer Zelle, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zum Zielgen komplementären Bereich aufweist, in welchem mindestens ein Nukleotid nicht komplementär zum Zielgen und mindestens ein Nukleotid mehr als zum Zielgen nicht komplementär zum Ursprungsgen ist.
- 15 3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei das zum Zielgen nicht komplementäre Nukleotid nicht am 3'- oder am 5'- Ende des Bereichs gelegen ist.
- 20 4. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Zielgen gegenüber dem Ursprungsgen eine oder zwei Punktmutationen aufweist.
- 25 5. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Ursprungsgen ein Proto-Onkogen und das Zielgen ein davon abgeleitetes Onkogen ist.
6. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Zelle eine Tumorzelle ist.

7. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ein Nukleotid des Bereichs nicht komplementär zum Zielgen ist und zwei Nukleotide des Bereichs nicht komplementär zum Ursprungsgen sind.
- 5 8. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei innerhalb der dsRNA mindestens ein Basenpaar nicht komplementär ist.
9. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA zumindest an einem Ende der dsRNA einen aus 1 10 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.
10. Verwendung nach Anspruch 9, wobei die dsRNA den Überhang ausschließlich an einem, insbesondere ihrem das 3'-Ende des Strangs S1 aufweisenden, Ende aufweist.
- 15 11. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Strang S1 oder ein gegebenenfalls in der dsRNA enthaltener Strang S2 zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.
12. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei 20 die dsRNA in einer Zubereitung vorliegt, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere zur intravenösen, intraperitonealen oder intratumoralen Infusion oder Injektion, geeignet ist.
13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei die Zubereitung aus 25 einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, und der dsRNA besteht.
14. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA in einem physiologisch verträglichen Puffer,

insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, oder von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Virus-Kapsid oder einem Kapsoid umschlossen vorliegt.

- 5 15. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA oral, mittels Inhalation, Infusion oder Injektion, insbesondere intravenöser, intraperitonealer oder intratumoraler Infusion oder Injektion, verabreicht wird.
- 10 16. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA in einer Dosierung von höchstens 5 mg, insbesondere höchstens 2,5 mg, bevorzugt höchstens 200 µg, besonders bevorzugt höchstens 100 µg, pro kg Körpergewicht pro Tag, einem Säugetier, vorzugsweise einem Menschen, verabreicht wird.
- 15 17. Medikament zur gezielten Hemmung der Expression eines vorgegebenen, gegenüber einem Ursprungsgen punktmutierten Zielgens in einer Zelle, enthaltend eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA), wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zum Zielgen komplementären Bereich aufweist, in welchem mindestens ein Nukleotid nicht komplementär zum Zielgen und mindestens ein Nukleotid mehr als zum Zielgen nicht komplementär zum Ursprungsgen ist.
- 20 18. Medikament nach Anspruch 17, wobei das zum Zielgen nicht komplementäre Nukleotid nicht am 3'- oder am 5'-Ende des Bereichs gelegen ist.
- 25 19. Medikament nach Anspruch 17 oder 18, wobei das Zielgen gegenüber dem Ursprungsgen eine oder zwei Punktmutationen aufweist.

20. Medikament nach einem der Ansprüche 17 bis 19, wobei das Ursprungsgen ein Proto-Onkogen und das Zielgen ein davon abgeleitetes Onkogen ist.
21. Medikament nach einem der Ansprüche 17 bis 20, wobei die 5 Zelle eine Tumorzelle ist.
22. Medikament nach einem der Ansprüche 17 bis 21, wobei ein Nukleotid des Bereichs nicht komplementär zum Zielgen ist und zwei Nukleotide des Bereichs nicht komplementär zum Ursprungsgen sind.

10 23. Medikament nach einem der Ansprüche 17 bis 22, wobei innerhalb der dsRNA mindestens ein Basenpaar nicht komplementär ist

24. Medikament nach einem der Ansprüche 17 bis 23, wobei die dsRNA zumindest an einem Ende der dsRNA einen aus 1 bis 15 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.

25. Medikament nach Anspruch 24, wobei die dsRNA den Überhang ausschließlich an einem, insbesondere ihrem das 3'-Ende des Strangs S1 aufweisenden, Ende aufweist.

20 26. Medikament nach einem der Ansprüche 17 bis 25, wobei der Strang S1 oder ein gegebenenfalls in der dsRNA enthaltener Strang S2 zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.

27. Medikament nach einem der Ansprüche 17 bis 26, wobei das 25 Medikament eine Zubereitung aufweist, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere zur intravenösen, intraperitonealen oder intratumoralen Infusion oder Injektion, geeignet ist.

28. Medikament nach Anspruch 27, wobei die Zubereitung aus einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, und der dsRNA besteht.

5 29. Medikament nach einem der Ansprüche 17 bis 28, wobei die dsRNA in dem Medikament in einer Lösung, insbesondere einem physiologisch verträglichen Puffer, oder von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Virus-Kapsid oder einem Kapsoid umschlossen vorliegt.

10 30. Medikament nach einem der Ansprüche 17 bis 29, wobei die dsRNA pro vorgesehener Verabreichungseinheit in einer Menge enthalten ist, welche einer Dosierung von höchstens 5 mg, insbesondere höchstens 2,5 mg, bevorzugt höchstens 200 µg, besonders bevorzugt höchstens 100 µg, pro kg 15 Körergewicht entspricht.

31. Verfahren zur gezielten Hemmung der Expression eines vorgegebenen, gegenüber einem Ursprungsgen punktmutierten Zielgens in einer Zelle, wobei eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) in die Zelle eingeführt wird und ein Strang S1 der dsRNA einen zum Zielgen komplementären Bereich aufweist, in welchem mindestens ein Nukleotid nicht komplementär zum Zielgen und mindestens ein Nukleotid mehr als zum Zielgen nicht komplementär zum Ursprungsgen ist.

20 25 32. Verfahren nach Anspruch 31, wobei das zum Zielgen nicht komplementäre Nukleotid nicht am 3'- oder am 5'-Ende des Bereichs gelegen ist.

30 33. Verfahren nach Anspruch 31 oder 32, wobei das Zielgen gegenüber dem Ursprungsgen eine oder zwei Punktmutationen aufweist.

34. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 33, wobei das Ursprungsgen ein Proto-Onkogen und das Zielgen ein davon abgeleitetes Onkogen ist.
35. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 34, wobei die 5 Zelle eine Tumorzelle ist.
36. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 35, wobei ein Nukleotid des Bereichs nicht komplementär zum Zielgen ist und zwei Nukleotide des Bereichs nicht komplementär zum Ursprungsgen sind.
- 10 37. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 36, wobei innerhalb der dsRNA mindestens ein Basenpaar nicht komplementär ist.
38. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 37, wobei die dsRNA zumindest an einem Ende der dsRNA einen aus 1 bis 15 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.
39. Verfahren nach Anspruch 38, wobei die dsRNA den Überhang ausschließlich an einem, insbesondere ihrem das 3'-Ende des Strangs S1 aufweisenden, Ende aufweist.
- 20 40. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 39, wobei der Strang S1 oder ein gegebenenfalls in der dsRNA enthaltener Strang S2 zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.
41. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 40, wobei die 25 dsRNA in einer Lösung, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, oder von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Virus-Kapsid oder einem Kapsoid umschlossen vorliegt.

### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eine Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur gezielten Hemmung der Expression eines vorgegebenen, gegenüber einem Ursprungsgen punktmutierten Zielgens in einer Zelle, wobei ein Strang S1 der dsRNA einem zum Zielgen komplementären Bereich aufweist, in welchem mindestens ein Nukleotid nicht komplementär zum Zielgen und mindestens ein Nukleotid mehr als zum Zielgen nicht komplementär zum Ursprungsgen ist.

## SEQUENZPROTOKOLL

5 <110> Ribopharma AG  
10 <120> Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure zur  
gezielten Hemmung der Expression eines vorgegebenen  
Zielgens  
<130> 422290EH  
<140>  
<141>  
15 <160> 13  
<170> PatentIn Ver. 2.1  
20 <210> 1  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Hepatitis C virus  
25 <400> 1  
gtcacggcta gctgtgaaag gtccgt  
<210> 2  
<211> 23  
<212> RNA  
30 <213> Hepatitis C virus  
<400> 2  
acggcuagcu gugaaagguc cgu  
35 <210> 3  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> Hepatitis C virus  
40 <400> 3  
ggaccuuuca cagcuagccg uga  
45 <210> 4  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> Künstliche Sequenz  
50 <220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sinn-Strang  
einer zu einer Sequenz des Neomycin-Resistenzgens  
komplementären dsRNA  
55 <400> 4  
gaugagggaua guuucgcaug a  
60 <210> 5  
<211> 21  
<212> RNA



<210> 11		
<211> 23		
<212> RNA		
<213> Künstliche Sequenz		
5		
<220>		
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:		
Antisinn-Strang einer zu einer Sequenz des		
Luziferasegens komplementären dsRNA		
10		
<400> 11		
cugcaacucc gauaaauaac gcg		23
15	<210> 12	
<211> 21		
<212> RNA		
<213> Hepatitis C virus		
20	<400> 12	
agacagucg a cuucagccug g		21
25	<210> 13	
<211> 21		
<212> RNA		
<213> Hepatitis C virus		
30	<400> 13	
aggcugaagu cgacugucug g		21

35

40

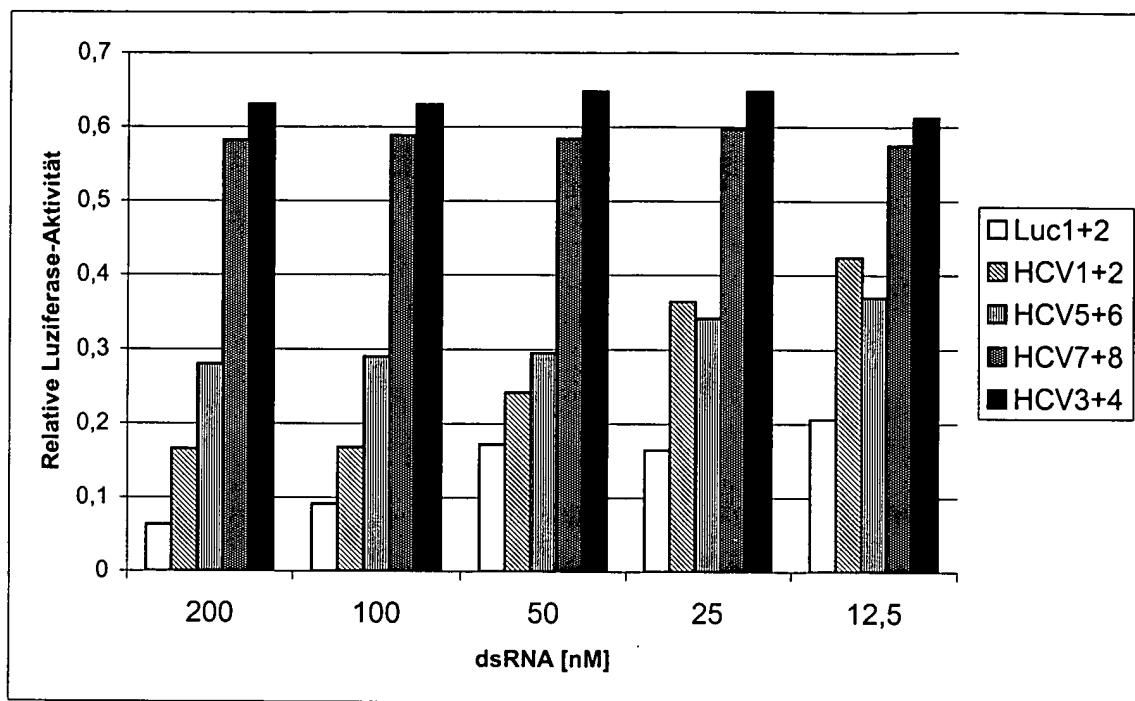


Fig. 1

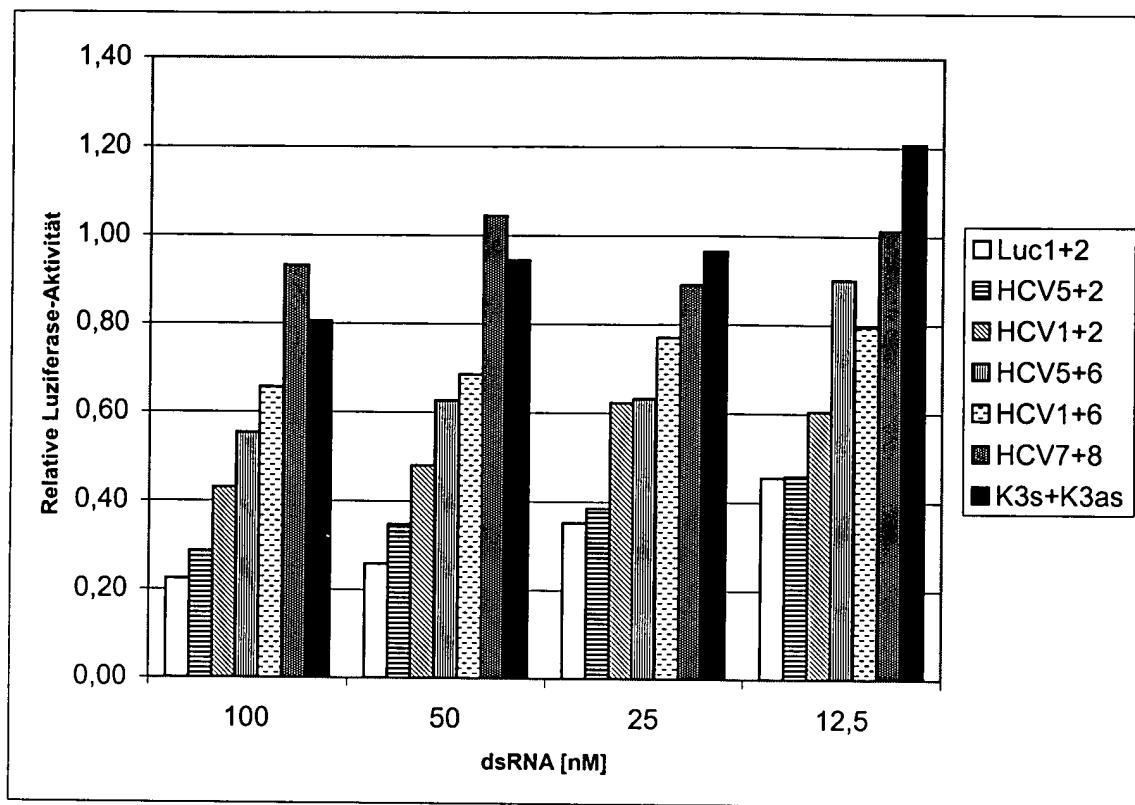


Fig. 2